

花生根瘤菌转吸氢基因的研究

摘 要

根瘤菌在固氮时,除了将 N_2 还原为 NH_3 以外,还释放出 H_2 ,造成能量的损耗。具有氢酶根瘤菌能循环再利用固氮过程中放出的 H_2 ,从而减少能量的损失和提高固氮效率。但农业上重要的根瘤菌大多数不具有吸氢酶活性,因此运用分子生物学技术,对根瘤菌吸氢基因进行克隆、定位和转移,以提高根瘤菌的固氮效率,增加植株含氮量,提高作物产量,具有重要的理论意义和实际应用价值。

通过三亲本杂交将含有花生根瘤菌吸氢基因的质粒 pZ55 (Tc^r) 转入花生根瘤菌 Ra12、Ra27、Ra34 等菌株 (Hup^- 、 Ap^r),在 YEM 抗性平板(Ap^r Tc^r 均为 $50\mu g/mL$)上初筛得到结合株 Rz34-1、Rz34-2、Rz12-10 等 (Hup^+ 、 Ap^r 、 Tc^r),通过质粒提取、吸氢活性和乙炔还原活性的测定。结果表明,这些结合株含有外源质粒 pZ55。在自生条件下,可诱导表达高吸氢活性;固氮活性也比受体株提高了 50%左右。说明质粒 pZ55 含有与在自生条件下吸氢活性表达相关的基因,实现了花生根瘤菌吸氢基因的种内转移。结合株在 YEM 双抗平板上传代培养,质粒可稳定存在。

用结合株 Rz34-2 回接花生,以不接种、接种受体株(Hup^-)和 L8-3 菌株(Hup^+)的作对照,结果表明接种结合株的根瘤的吸氢活性比不接种的和接种受体株的分别提高了 4 倍和 3.8—4.7 倍,比接种 L8-3 的提高了 18%—50%;乙炔还原活性也分别比对照组的提高 40%—140%、17%—43%和 30%,植株叶片干物质的积累比不接种的和接种受体株的分别提高了 6.3%和 7.7%;植株叶片含氮量也比接种的和接种受体株的分别提高了 17%和 10%;籽实总氮比不接种的和接种受体株的分别提高了 8.9%和 10%,比接种 L8-3 的提高了 5.85%;花生产量比不接种的和接种受体株的分别提高了 18.75%和 9.62%,比接种 L8-3 的提高了 7.95%。说明结合株含有在共生条件下吸氢活性表达所需的基因,吸氢基因的表达明显促进了花生根瘤菌的固氮作用,增加植株含氮量和产量。从大田回接的根瘤中重新分离根瘤菌,经抗性检测和质粒提取,发现只有 20%左右的外源质粒保持稳定。

通过三亲本杂交法,将含有花生根瘤菌吸氢基因的重组质粒 pZ55 导入 Hup^- 的豌豆、大豆、四季豆和绿豆的根瘤菌,得到相应的转移结合株 Lz5、Jz10、Kz221 和 Mz31 等菌株 (Ap^r Tc^r)。质粒提取结果表明,质粒 pZ55 已转入结合株,实现了花生根瘤菌吸氢基因的种间转移。吸氢活性测定结果表明,大豆根瘤菌结合株 Jz10 和绿豆根瘤菌结合株 Mz31 等在自生条件下,可诱导出较高的吸氢活性,而四季豆根瘤菌结合株 Kz221 和豌豆根瘤菌结合株 Lz5 却没有检测到吸氢活性。

关键词:花生根瘤菌,吸氢基因,三亲本杂交

Studies of tranfering *Rhizobium arachis* hup genes

Abstract

H₂-uptake(Hup) hydrogenase in *Rhizobia* cells can oxidize H₂ produced by nitrogenase, and couple the process with ATP production. An efficient H₂-recycling capability is a desirable characteristic for *Rhizobia* strains, but various of agricultural important *Rhizobia* strains have not significant Hup activity. It is important to clone, analyse and transconjugate the H₂-uptake genes to the Hup⁻ strains.

The recombinant plasmid pZ55 which contains uptake hydrogenase genes has been constructed and established in *E.coli* HB101. pZ55, the donor, was mobilized from *E.coli* strain to the Hup⁻ recipients Ra12, Ra27, Ra34 strains etc by triparental mating using the plasmid pRK2013 as the helper plasmid. The recombinant plasmid pZ55 was resistant to tetracycline(50 μ g/ml), but was sensitive to ampicillin. The recipients isolated from wild peanut nodules were resistant to ampicillin(50 μ g/ml), but sensitive to Tetracycline. The presumptive transconjugants Rz34, Rz12 etc carrying recombinant plasmid pZ55 were screened by antibiotic-resistance on the YEM media which contains ampicillin(50 μ g/ml) and tetracycline(50 μ g/ml). Under

free-living condition, the analytic results of H_2 -uptake hydrogenase and nitrogenase activity indicated that transconjugants Rz12, Rz34 have relatively high H_2 -uptake activity, the nitrogenase activity increased by 50% in comparison with recipients.

Plant test was used for researching the symbiotic expression of H_2 -uptake in transconjugant Rz34-2. No inoculated, inoculated with recipient Ra34(Hup^-) and with strain L8-3(Hup^+) were used as the controls. The H_2 -uptake hydrogenase activities of nodules inoculated with different strains were detected respectively. The results indicated that H_2 -uptake activity of nodules inoculated with transconjugants Rz34-2(Hup^+) was 3.8–4.7 fold higher than that of nodules inoculated with recipient Ra34, was 4 fold higher than that of nodules with no inoculated. Compare the inoculation of Rz34-2 to Ra34 and without inoculated, the C_2H_2 reduction activities of nodules increased by 40%--140%, 17%--43% and 30%. The total nitrogen content of plant leaves and seed and dry matter accumulation of the leaves inoculated with transconjugants Rz34-2 increased by 17%, 8.9%, 6.3% and 10%, 10.2%, 7.7% in comparison to those without inoculated and inoculated with recipient respectively. The peanut yields inoculated with transconjugant increased by 18% in comparison with that without inoculated, and by 9.6% in comparison with that of inoculating with recipient. The stability of foreign plasmid in transconjugants was analysed under free-living and symbiotic conditions. The results indicated that foreign plasmid was stable after several generations under free-living condition with the antibiotic stress. But after symbiosis with peanut plants, Elimination frequency of recombinant plasmid reaches 80%.

Interspecies transfer of *Rhizobium arachis* H_2 -uptake genes to *R. vaigaris*, *R. aerues*, *R. leguminusarum* and *R. japonicum* was also carried out. The transconjugants were constructed by triparental mating and confirmed as plasmid isolation. H_2 -uptake activity in transconjugants *R. japonicum* and *R. aerues* was relatively high. But no activity was detected in *R. vaigaris* and *R. leguminusarum*.

Key word: *Rhizobium arachis*, triparental mating, H_2 -uptake gene

目录

1 前言	1
2 材料与方法	12
2.1 菌株与质粒	12
2.2 培养基与培养条件	12
2.3 主要试剂与仪器设备	13
2.4 花生根瘤菌野生菌株的分离及特性的测定	15
2.5 三亲本杂交	17
2.6 重组质粒 pZ55 与结合株质粒的检测	17
2.7 结合株在自生条件下吸氢与固氮活性的测定	18
2.8 花生根瘤菌结合株回接试验	18
2.9 结合株在共生条件下吸氢与固氮活性的测定	19
2.10 根瘤菌结合株重组质粒稳定性的检测	19
2.11 花生植株叶片的干物质及其总氮的测定	19
2.12 花生产量及花生籽实含氮量的测定	19
2.13 花生根瘤菌吸氢基因的种间转移	20
3 结果与分析	20
3.1 根瘤菌野生菌株的分离及特性测定	21
3.2 pZ-55 的接合转移	22
3.3 结合株在自生条件下的吸氢和固氮活性	24
3.4 花生根瘤菌结合株在共生条件下的吸氢和固氮活性	25
3.5 花生根瘤菌结合株在共生条件下重组质粒稳定性的检测	26
3.6 结合株接种花生的效果	27
3.7 花生根瘤菌吸氢基因的种间转移	32
4 讨论	36
参考文献	41
致谢	49

学校编码: 10384

分 _____ 类 号

密级

学

号 : 9626011 _____ UDC

学系
花生根瘤菌转吸氢基因的研究

学 位 论 文

花 生 根 瘤 菌 转 吸 氢 基 因 的 研 究

王 振 宇

指导教师: 刘 月 英 副教授

厦门大学生物学系

申请学位级别: 硕 士 专业名称: 微 生 物 学

论文提交日期: 1999 年 8 月 日 论文答辩日期: 1999 年 8 月 日

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

1999 年 8 月 日

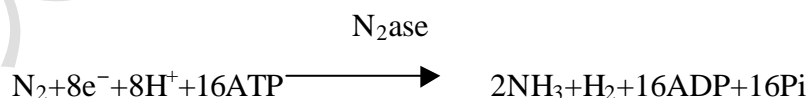
厦 门 大 学 生 物

1 前言

氢酶是一类在生物体内催化 H_2 的消耗或产生的酶类，早在 1931 年，Stephenson 和 Stickland 首次报道了在 *E.coli* 中存在氢酶^[1]。随后的几十年，相继在不同种属菌株中发现氢酶的存在^[2]。其中，发现根瘤菌在固氮时，固氮酶催化 N_2 还原成 NH_3 的同时，还催化放 H_2 反应，放 H_2 所消耗的能量相当于固氮总能量消耗的三分之一^[3]。然而，直到 1971 年，Nakos 和 Mortenson^[4]第一次从巴氏芽孢梭菌获得纯化的氢酶后，对氢酶的研究才得以蓬勃发展。1976 年，Evans 等^[5]首先发现具有氢酶根瘤菌能再循环利用固氮过程中所放出的 H_2 ，从而减少能量的损失和提高根瘤菌的相对固氮效率。八十年代，随着基因工程的兴起，氢酶的研究也深入到分子生物学阶段。由于能源危机、环境污染等社会问题的日益严重，对固氮生物特别是根瘤菌氢酶的研究更加引人注意，人们期望通过对根瘤菌氢酶的研究使固氮酶反应所产生的 H_2 再循环利用，从而提高农业上生物固氮效率。

1.1 吸氢酶与固氮作用的关系

按经典的分类法，氢酶可分为两类：1) 双向的氢酶，既可催化 H_2 的产生也可催化 H_2 的氧化；2) 单方向的氢酶，只催化 H_2 的吸收^[6]。 H_2 代谢与固氮关系的研究始于 40 年代初，Wilson 等首先报道了棕色固氮菌及豌豆根瘤菌类菌体在固氮时氢酶活性提高，后来，Kamen 等观察到 N_2 抑制深红螺菌的放氢，并因此发现了它们也能固氮；六十年代，Bulen 等首先证明固氮菌的固氮酶催化需 ATP 和还原剂的放氢反应，随后在其他固氮菌、根瘤菌、光合固氮菌、蓝细菌中相继发现了固氮酶能催化放氢反应^[7]；1967 年 Dixon^[8]通过实验指出不放氢的豌豆根瘤菌类菌体中含有一种参与固氮所释放氢的再循环利用的酶(吸氢酶)。现已清楚，固氮酶在固氮过程中伴随着放氢是它固有的特性。试验证明，在固氮酶(N_2ase)两个蛋白组分的最适比例下，一个大气压 N_2 和最适还原剂等条件下，固氮酶每催化一分子 N_2 还原形成 2 分子 NH_3 的同时产生一分子 H_2 ，其反应简式为：



反应式清楚地表明两个质子还原为一分子 H_2 需一对电子，消耗 4 个 ATP，占固氮总 ATP 消耗的 1/4，也即在最适条件下，有 25% 的电子流是用于还原质子产生 H_2 。但事实并非如此，通常情况下，用于放 H_2 的能量往往高于 25%。在共生固氮中放氢消耗固氮总能量的 40-60%，有时甚至高达 80%^[9]。实验证明，在没有 N_2 存在的条件下(如用 Ar 代替 N_2)，全部固氮酶的电子用于放氢，放氢造成能量的净损失，成为限制生物固氮效率的重要因素。吸氢酶可以回收 H_2 ，并与电子传递链偶联。如果固氮微生物同时含有吸氢酶，就可以部分回收由固氮酶体系放氢所消耗的能量和还原力，尤其对于豆科植物根瘤菌，有吸氢酶的存在，根瘤菌和宿主植物形成更高效的共生体系，理论上可以避免化肥带来的不利影响外，还可以达到增加植物含氮量和产量的目的。

1.2 吸氢酶的生理效应

吸氢酶的存在,可以减少固氮生物固氮带来的能量损失。Conrad 和 Seiler^[10]测算了全球农业的豆科植物,每年的放氢量可达 $2.1-4.4 \times 10^{12}$ 克。巨大的能量损失是显而易见的,在能源日趋紧张的今天,势必引起人们极大的关注。1972 年 Dixon^[11]在实验的基础上首先提出了吸氢酶在固氮体系中的生理效应: a)作为一种降低胞内 H_2 浓度的方式,消除对固氮酶的抑制; b)通过 H_2 的产生和回收,吸氢酶可以回收固氮酶放 H_2 而浪费的能量; c)作为固氮酶防氧保护的一种机制。此后大量的实验结果证明了 H_2 代谢可导致 ATP 合成,获得还原力,从而增加能量的利用率^[3,11]。Evans 及其同事^[12,13,14,15]证明了往大豆根瘤菌的培养液中加入 H_2 ,可增加固氮酶活性,而且也可在较高 O_2 分压下表达活性。同时,胞质中 ATP 含量也提高了近 50%,如果同时添加呼吸链的抑制剂(如碘乙酸),ATP 含量可增加 4 倍。他们还指出即使有碘乙酸存在,由 H_2 通过需 O_2 的氧化磷酸化获得 ATP,也足以支持菌体的固氮酶活性。与此一致的是,从 Hup^- 菌株分离得到的根瘤类菌体放出大量的 H_2 ,而具有吸氢酶的 Hup^+ 菌株类菌体很少或没有 H_2 的释放,说明,吸氢酶的存在可以回收自身固氮酶系统放出的 H_2 ^[16]。Simpson 等^[17]发现去阻遏的大豆根瘤菌 Hup^+ 菌株具有核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶(RuBp),它与氢酶同时被 H_2 诱导协同表达活性,且同时被底物(如琥珀酸)阻遏,而且 Hup^- 的大豆根瘤菌株不具核酮糖二磷酸羧化酶活性。Evans 等^[13]研究发现在一种特定的自生诱导培养基上,大豆根瘤菌的氢酶活性可增加 47 倍, RuBp 活性增加 12 倍,后者在细胞中的含量足以支持细胞自养生长(代时为 20h)。研究者很自然地想到是否在共生条件下氢酶的存在仍然能增加固氮效率,是否可增加根瘤的生长,进而达到促进宿主植物含氮量的目的,同时提高能量的利用率,减少呼吸作用,减少对光合作用能量的需求,增加植株干物质的积累。研究者进行了有益的探索,如 Schubert 等^[9]在大豆根瘤菌的回接试验中,获得总氮增加 31%,干重增加 24%的结果; Pawha 等^[18]在绿豆的回接试验中也得到总氮增加 21-46%,干重增加 13-56%的结果; Dejong 等^[19]在豌豆的共生试验中测得总氮增加 18-46%,干重增加 14-56%; Evans 等^[16]用含有大豆根瘤菌吸氢基因的遗传工程菌株 pJ18HR(Hup^+)及只差吸氢基因的等位基因变株 pJ18(Hup^-)进行了严格控制的共生回接试验,结果发现叶片总氮增加 27%,种子总氮增加 8.6%,干重增加 11%。并结论性地提出:采用 Hup^+ 菌株回接能提高宿主植物的产量及总氮量。大量的共生试验得到了一致的结果,1984 年 Haugland^[20]总结前人的结果,提出吸氢酶在根瘤菌中为大家所公认的有益的生理作用:

- (1) 吸氢酶可以回收由 N_2ase 放 H_2 所损失的部分能量;
- (2) 通过氢的氧化消耗氧,从而降低胞内氧水平,消除 O_2 对 N_2ase 的抑制作用;
- (3) 氢的氧化防止了胞内氢的积累,避免了 H_2 对 N_2ase 的反馈抑制作用;
- (4) 氢氧化为细胞提供了还原力 $NADPH_6$ 。

1.3 根瘤菌吸氢基因(hup gene)的研究

获得高吸氢活性根瘤菌菌株的传统方法是从在共生条件下具有优良性状的野生菌株中分离筛选得到^[19,21]。八十年代,随着基因工程的兴起和发展,人们通过分子生物学的手段,将吸氢基因转移到没有吸氢活性(hup^-)的菌株中,使原本不具吸氢活性的菌株获得吸氢酶系统,具有 H_2 再循环的能力,这种方法依赖

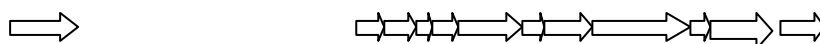
于对根瘤菌吸氢基因的克隆、分析和转移。在根瘤菌中，目前，对 hup 基因研究较清楚的有慢生型大豆根瘤菌(*B.japonicum*)和豌豆根瘤菌(*R.leguminosarum*)。已知吸氢基因由结构基因(包括编码大、小亚基 hupL、hupS 的基因)和一系列调节基因组成的基因簇，至少有 16 个共同存在的基因对于根瘤菌 H_2 代谢是必需的^[22]，近年来，不断有新的吸氢酶相关基因发现。

1.3.1 大豆根瘤菌吸氢基因的研究

Cantrell 等^[23]用 Cosmid pLAFR1 为载体构建了大豆根瘤菌的基因文库，并从中分离了 hup 基因。这项突破性工作极大推动了大豆根瘤菌吸氢基因的研究。Lambert 等^[24]得到含有表达吸氢酶活性所必需的全部基因的重组质粒 pHU52，它可互补所有 Hup⁻的大豆根瘤菌，也可互补从田间分离的其他大豆、苜蓿、豌豆和三叶草根瘤菌的 Hup⁻菌株；Zuber 等^[25]从 pHU52 中亚克隆得到 5.9kb 的 EcoR I 片段，以 pMZ545 为表达载体，用免疫杂交法证明该基因片段包含编码氢酶大小亚基的基因。Sayavedra-Soto 等^[26]对该片段进行了序列测定，确认此为大豆根瘤菌吸氢酶大小亚基(HupS, HupL)的结构基因。此后，大豆根瘤菌吸氢基因研究集中于吸氢酶基因活性表达的调控。Van Soom 等^[27]首次报道大豆根瘤菌结构基因下游 9kb 处有一个不完整和三个完整的开读框(ORFs) hypD'、hypE、hoxX 和 hoxA，并完成了这四个开读框的序列测定，推断它们可能是氢酶的转录调节因子，参与了自生条件下通过 H_2 、 O_2 、Ni 来调节氢酶的合成，其中 hypD' 基因产物可能与 [Fe-S] 簇的结合有关；Durnowicz 等^[28]认为 HoxX 和 HoxA 分别是信号和调节蛋白，共同组成吸氢酶转录必需的双组分调节系统，利用符合读码的缺失突变证明：hoxX 的缺失导致氢酶活性只为野生株(hup⁺)的 30-40%，而使失活的未成熟的氢酶大亚基积累。说明 HoxX 基因产物参与了氢酶的加工成熟；Fu 和 Maier 等^[29]发现与结构基因(hupS, hupL)属于同一操纵子的下游区段还有 hupC, hupD, hupF。认为 hupCDF 与氢酶的翻译后调节有关；同年，他们又报道了在 hupF 下游存在另一操纵子，至少编码 hupG, hupH, hupI, hupJ, hupK, hypA 及 hypB 七个基因^[30,31,32]。认为 hupG 参与吸氢酶亚单位的加工；Black 等^[33]在 hupSL 上游发现了两个开读框 hupU 和 hupV，分别编码 35.4KD 和 51.8KD 的蛋白质，而且它们分别与 [NiFe] 氢酶 HupS 和 HupL 具有同源性，HupU 缺少 HupS 的信号肽，HupV 缺少 HupL 的 c-末端序列，它们具有 Ni 结合位点，是 Ni 感受物，也可能感受 H_2 、 O_2 的变化。Hupuv 的缺失突变 Hupv⁻, Hup(uv)⁻可解除吸氢酶合成的阻遏，表明它们还参与吸氢酶表达的负调控。最新研究表明^[34,35,36]，在结构基因下游 6 kb 处，即紧接 hypAB 的下游区域对吸氢酶的合成是必需的，分别命名为 hypF、hypC、hypD，与 hoxXA 紧连，hypF 编码 753 个氨基酸，含有其他 hyp 蛋白所具有的特征性的两个“锌指”(Zinc Finger)结构。极性突变的互补分析表明：HypABFCD 和 hupGHIJK 在一个操纵子调控下的共转录。

下图为慢生型大豆根瘤菌吸氢基因的物理图谱^[34]。

Overlap(nt)



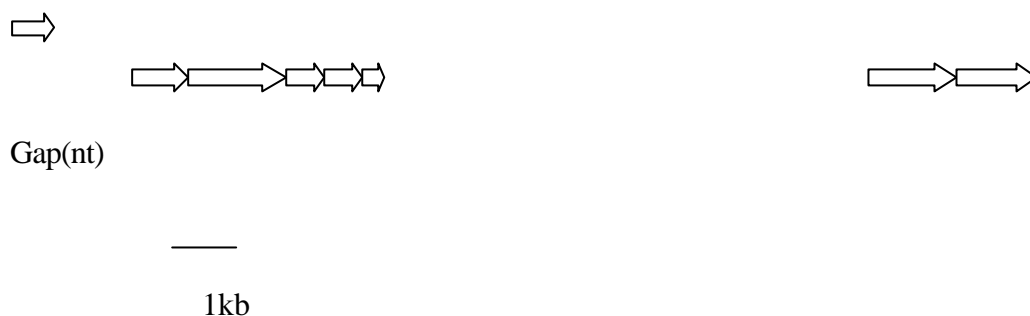


图 1. 慢生型大豆根瘤菌吸氢基因的物理图谱

Fig. 1. physical maps of the *hup* gene cluster in *Bradyrhizobium japonicum*

1.3.2 豌豆根瘤菌吸氢酶基因的研究

豌豆根瘤菌吸氢结构基因大小亚基与慢生型大豆根瘤菌有很高的同源性，分别达到 89.3%和 89.4%^[26]，但它也具有自己的独特性，例如大豆根瘤菌的吸氢基因位于染色体上，而豌豆根瘤菌的吸氢基因位于共生大质粒上^[37,38]，豌豆根瘤菌具有 *hupE* 基因，而大豆根瘤菌却没有^[39,40]；二者虽都能在共生条件下表达吸氢活性，但在自生条件下，豌豆根瘤菌不能表达活性，大豆根瘤菌则可以，所以豌豆根瘤菌 *Hup*-突变株的筛选以及互补试验都必须在根瘤菌的类菌体中进行^[41]。

Leyva 等^[38]用 pLAFR1 为载体构建了豌豆根瘤菌吸氢基因的基因文库，并用大豆根瘤菌的吸氢酶结构基因片段为探针，钓出吸氢基因，得到含有豌豆根瘤菌吸氢基因的重组质粒 pAL618。pAL618 中携带 21kb 的豌豆根瘤菌 DNA，其中与吸氢酶有关的基因约有 15kb。它不仅能互补用 Tn5 插入形成的 *Hup*⁻菌株，使其重新恢复吸氢能力，也能提高 *Hup*⁺菌株的吸氢活性^[42]。互补分析发现 *hup* 基因有六个转录单位，编号为：*hup* I ~ VI^[43] (Leyva 等 1990)，也有人认为是四个转录单位^[44]。编码吸氢酶大小亚基的基因 (*hupL*, *hupS*) 位于 *hup* I / II 转录单位上，还包括 *hupC*、*hupD*、*hupE* 和 *hupF* 四个基因^[39]，1990 年 Hidalgo 等^[45]进行了 *hupLS* 的序列测定，他们的研究发现 *hupC* 基因产物具有较强的疏水性，并参与编码 b-型细胞色素的合成，它与电子传递链密切相关；*hupD* 基因产物的疏水区可能与跨膜蛋白的结合位点有关；*hupE* 与全酶表达活性有关；*hupF* 基因产物功能尚不清楚。*hup* III/IV 区编码 *hupG*、*hupH*、*hupI*、*hupJ* 和 *hupK*，长约 3.2kb，*hupG* 基因产物与吸氢酶催化过程有关，*hupI* 编码的蛋白和其它细菌的红氧还蛋白非常相似，因而可能参与 [FeS] 或 [NiFeS] 的组装或在电子传递过程中作为中介电子传递体和非血红素蛋白的铁配体^[46]；*hup* V/VI 区编码基因 *hypA*、*hypB*、*hypF*、*hypC*、*hypD*、*hypE* 和 *hypX*，这些基因在共生条件下的表达可能与 Ni 的代谢有关^[47,48]，Hernando 等^[49]发现 *hypA* 基因能在豌豆根瘤菌类菌体中特异表达，*hyp*⁻突变株不仅影响氢酶 Ni 的含量，而且影响亚单位的正常加工，推测它们为吸氢酶活性表达和酶的成熟加工所必需。他们认为 *hypBFCDEX* 组成一个操纵子，受控于 *hypB* 上游(位于 *hypA* 内)的氧调节启动子，这是一个在自生、共生条件下都能激活的 Fnr-型启动子；*hypX* 是与大豆根瘤菌的 *hoxX* 同源性很高的调节基因片段 (57%相同，73%相似)，它是吸氢酶全酶活性表达和结构多肽加工的必需基因，序列分析表明它属于 N₁₀-甲酰四氢叶酸和烯酰 CoA 水合酶/异构

酶家族, hypX 下游没有 H₂ 回收所必需基因。豌豆根瘤菌的吸氢基因在共生质粒上的排列顺序是: hupSLCDE FGHJKhypABFCDEX, 它们紧密连接, 同一方向转录。豌豆根瘤菌吸氢基因的物理图谱如下^[50]。

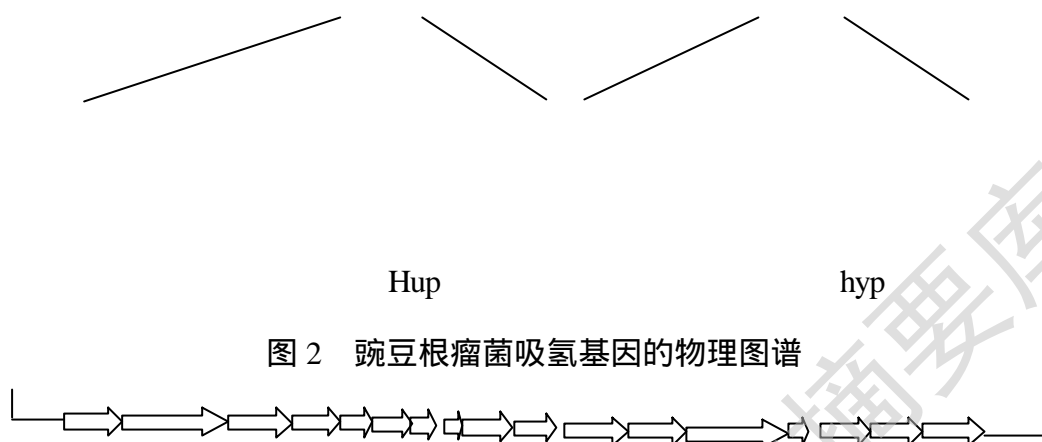


图 2 豌豆根瘤菌吸氢基因的物理图谱

Fig.2 Physical map of the hup genes cluster in *Rhizobium leguminosarum*

1.3.3 花生根瘤菌吸氢基因的研究

花生根瘤菌吸氢酶基因的研究在国外尚未见报道。花生作为重要的粮油两用经济作物, 是世界上四大豆类植物之一, 其年产量可达 1.6×10^7 吨^[7]。仅我国每年花生种植面积就有 3~4 千万亩, 花生根瘤菌的共生固氮, 能提供花生生长所需氮素的 $1/3 \sim 2/3$ ^[51]。由于吸氢酶对固氮有明显的促进作用, 因此选育和构建吸氢效率高花生根瘤菌菌株, 获得在共生条件下具有高吸氢活性的花生根瘤菌共生固氮体系具有实际应用价值, 我系固氮研究室自 1984 年开始一直从事花生根瘤菌吸氢酶特性的研究。许良树等^[52]从国内外收集的大量菌株中筛选出少数有吸氢活性的菌株。吕荣富等^[53]用具有吸氢活性的代表性菌株进行吸氢活性的诱导表达研究, 发现花生根瘤菌 L8-3 菌株除能在异氧条件下诱导出吸氢外, 还能以 CO₂ 为唯一碳源, 以氢为唯一能源进行化能自养生长, 诱导出高吸氢活性。许良树等^[54]研究还发现, 花生根瘤菌的吸氢酶与固氮酶存在密切的相关性, 吸氢可以支持固氮。黄南仲等^[55]采用厌氧技术及防止蛋白聚合等措施, 从花生根瘤菌类菌体分离并纯化了膜结合态的吸氢酶, 纯化的氢酶含有 65KD 和 35KD 两个大小亚基, 具有较高的比活性。类菌体 H₂ 氧化体系研究结果发现在 H₂ 氧化过程中有质体醌、cytB、cytC 和 cytA 等参与并与末端氧化酶相偶联^[56]。1996 年王永保等^[57]在已有的研究基础上, 选择具有较高吸氢活性的花生根瘤菌 L8-3 为出发菌株, 以 cosmid pLAFR3 为载体, 构建了花生根瘤菌吸氢基因文库, 并以生物素化的豌豆根瘤菌吸氢酶结构基因探针^[58]和 PCR 法筛选出可能含有 hup 基因的阳性克隆子。王建锋等^[59]对重组质粒 pZ55 包含的外源基因进行酶切分析, 并推测 6.4kb 的 EcoR1 片段可能含有完整的吸氢酶结构基因, 经亚克隆后, 利用地高辛化的豌豆根瘤菌吸氢酶结构基因探针杂交进一步确证了含有吸氢基因, 并得到花生根瘤菌吸氢基因嵌和质粒初步的酶切物理图谱。

1.4 根瘤菌转吸氢基因的研究

Hup⁺菌株的获得经历了从野生菌株中分离筛选,到诱变剂的定向诱变再到基因工程菌株的构建, Brewin 等^[37]首先实现了含吸氢基因的质粒 pIJ1008 在豌豆根瘤菌中的转移,在共生条件下使吸氢活性得到表达。Dejong 等^[19]又把质粒 pIJ1008 转入不同遗传背景的豌豆根瘤菌得到 Hup⁺菌株, Hup⁺菌株回接试验发现寄主植物总氮增加 18—56%; Bedmar 等^[60]把含豌豆根瘤菌 hup 基因的质粒 pIJ1008 转入苜蓿根瘤菌,重组质粒虽然存在于类菌体中,但只检测到较低水平的吸氢酶活性,认为共生条件下吸氢酶的表达受到宿主的很大影响; Lambert 等^[61]也成功地将大豆根瘤菌的吸氢基因转入 Hup⁻菌株,在自生条件下互补了 Hup⁻菌株,同时,把大豆根瘤菌的吸氢基因转入到苜蓿根瘤菌和豌豆根瘤菌,实现了依赖 H₂ 的亚甲基蓝反应。经典的转吸氢基因的试验由 Evans 等^[16]在 1985 年设计完成,他用含有大豆根瘤菌吸氢基因的遗传工程菌株 pJ18HR(Hup⁺)转入只差等位基因的变株 pJ18(Hup⁻),同时进行严格控制的回接对比试验,结果发现大豆叶片、种子总氮量和干重都有不同程度的增加,并结论性地提出吸氢基因的表达促进固氮作用; Cantrell 等^[23]构建了含慢生型大豆根瘤菌吸氢基因的质粒 pHU1,并结合转移到 hup⁻点突变的大豆根瘤菌株,使其成为 Hup⁺菌株,并具有自养生长的能力(以 H₂ 为能源, CO₂ 为碳源)。Leyva 等^[38]将含豌豆根瘤菌吸氢基因的质粒 pAL618 转移至由 Tn5 插入形成的 Hup⁻菌株,并使其恢复吸氢活性,Palacios 等^[42]把它转入 Hup⁺菌株,提高了菌株的吸氢活性;龙敏南等^[62]将 pAL618 转移到花生根瘤菌 NB2 中,结合株在自生条件下吸氢活性提高了 14 倍,共生条件下的吸氢活性也提高了 1~2 倍。吴永强等^[63]构建含大豆根瘤菌吸氢基因的嵌合质粒 pHR11、pHR4 和 pHR10,并转入阴沟肠杆菌(hup⁻),均获得表达;王刚等^[64]将含有花生根瘤菌吸氢基因的质粒 pZ55 通过三亲本杂交导入诱变株 Ln-1(hup⁻),使后者表达了很高的吸氢活性。另外, Sajid 等^[65]利用野生型的 Hup⁺、Hup⁻和转吸氢基因的工程菌株(Hup⁺)同时进行木豆的回接对比试验,不仅得到了工程菌株在自生条件下的表达,而且工程菌株接种的植株干重增加 10~27%。目前,虽然实现了不同菌株吸氢基因的转移,但也有报道转吸氢基因未达到预想的结果,这有待于对氢酶表达调控的深入了解。

1.5 根瘤菌吸氢基因在自生和共生条件下的差异表达

(Differential Expression)

吸氢酶结构基因只占吸氢基因的一小部分,它的表达受到调节基因的严格调控,在自生、共生两种截然不同的状态下,调节基因的表达受到 H₂、O₂、Ni 等外界因素的影响^[66],从而也调控结构基因的表达。最明显的例子就是豌豆根瘤菌的吸氢基因只能在共生条件下表达。这方面的研究越来越引起人们的兴趣。

随着工程菌株的构建,人们将在自生条件下具吸氢活性的菌株回接相应宿主植物,考察其在共生条件下的表达,发现吸氢基因在两种状态下存在着差异表达。大豆根瘤菌的差异表达最早由 Lambert 等^[61]发现,含 Cosmid pHU1 的大豆根瘤菌在自生条件下不能表达活性,但含 pHU1 的苜蓿和大豆根瘤菌类菌体却是 Hup⁺,而且含有 pHU1 的大豆根瘤菌类菌体能回收由固氮反应放出的 90% 的 H₂。含有质粒 pHU52 的菌株在自生、共生条件下均能表达活性,而 pHU52 与 pHU1 的差异仅在于 pHU52 含有 5.5kb 的 EcoR1 片段,因此他们认为此片段为大豆根瘤菌吸氢酶自生表达所必需,而共生则不必。Van Soom 等^[67]认为 HoxA 是大豆根瘤菌吸氢表达的激活因子(在别的固氮生物中也起着同样的作用),但是,在

共生条件下, HoxA⁻突变株的吸氢酶活性仍可达到野生 Hup⁺菌株的活性水平, 因此认为 HoxA 可能不参与共生条件下吸氢酶表达的调节, 大豆根瘤菌必然存在另一共生专一性的、吸氢酶表达的激活因子, Durmowicz 等^[28]也对 HoxX 和 HoxA 进行了致突变研究, 结果发现 HoxA 的缺失突变和 Hox(XA)⁻突变株, 自生条件下不表达吸氢活性, 而 HoxX⁻、HoxA⁻、Hox(XA)⁻突变株在共生条件下却表达了吸氢活性, 同时, 提出大豆根瘤菌吸氢酶的表达同时受控于固氮的调节, 但并非 NifA 蛋白。Durmowicz 等^[68]研究了大豆根瘤菌固氮调节蛋白 NifA、FixK₁ 和 FixK₂ 在吸氢结构基因共生表达中的功能, 发现 FixK₁⁻和 FixK₂⁻突变株的类菌体的吸氢酶活性非常低, 而且, 类菌体中没有吸氢酶蛋白, 说明它们参与共生条件下吸氢酶表达的转录激活, 而自生条件下, 活性表达为 H₂、O₂、Ni 调节的转录激活。

Palacios 等^[42]报道豌豆根瘤菌吸氢结构基因在自生条件下不能表达活性, 必需共生环境的诱导, 解除 hup 结构基因的阻遏, 与根瘤类菌体中固氮基因共同表达。Hernando 等^[44]报道, 豌豆根瘤菌吸氢酶基因在自生条件下存在部分调节基因的表达, 他们通过实验证明在 hup V/V_I区域的基因在微氧条件诱导表达, hup V/V_I区编码 hyp 基因簇形成两个复杂的操纵子 (hypA 和 hypBCFDEX), 可能的功能是在不同的生理条件下表达不同的吸氢酶异构体, 他们设想: hyp 基因的自生表达 (微氧条件下) 是共生条件下吸氢酶合成的前提条件, 在吸氢酶共生表达时, 转录激活只作用在 hup 区而非 hyp 区。它们的表达不依赖于 NtrA, 而受 fixLJ 系统调节^[42], nif (固氮) 基因和 hup 基因表达受同一调节蛋白控制。Gutierrez 等^[69]提出在微 O₂ 条件下, 调节 nif 和 hup 基因的调节蛋白就是 FnrN; Hernando 等^[49]又一次指出豌豆根瘤菌吸氢基因的十八个基因存在自生、共生条件下的差异表达, 认为 hypA 是氢酶加工和活性表达必须的调节蛋白, 而 hypA 是由尚不明确的共生信号激活自身的启动子转录表达。hypA⁻突变株类菌体的吸氢酶活性只有野生株的 1~3%, 而固氮酶活性没有差别, 但与 hypBCFDEX 操纵子不同的是, 在自生微 O₂ 条件下并不表达, 与 hupSL⁻一样需共生环境的诱导, hypBCFDEX 操纵子的启动子位于 hypA 编码的区域。豌豆根瘤菌吸氢酶结构基因表达是由共生调节蛋白 NifA 激活的位于 hupSL 上游的一个 σ^{54} 依赖型的启动子启动, 由于 hypA 的启动子不具 σ^{54} 依赖型特征, NifA 不可能激活 hypA^[70,71]。不同种菌株 hypA 基因同源性比较发现 HypA 蛋白包含一比较保守的[CX₂CX₁₂CX₂]半胱氨酸簇, 而[CX₂C]结构是很多生物[Fe-S]偶合区域^[72], 可以推测 HypA 含有[Fe-S]簇, 在吸氢酶成熟必需的 Ni 嵌入过程中起到氧化还原的作用, 氨基酸替代突变影响了半胱氨酸簇即是一个证明。总之, 虽然 hypA 的具体功能未知, 但它是豌豆根瘤菌吸氢酶亚单位的成熟和活性表达所必需的, hypA 和 hypBCFDEX 的差异表达模式说明了 hypA 在吸氢酶合成中的独特功能^[49]。

本文在已有的工作基础上, 探讨了含花生根瘤菌吸氢基因的重组质粒 pZ55 通过三亲本杂交转移到 Hup⁻的野生型花生根瘤菌, 所得到的结合株在自生和共生条件下氢酶的表达, 以及结合株回接花生的效果。并探讨花生根瘤菌吸氢基因种间转移及表达的可能性。

2 材料与方法

2.1 菌株与质粒

本研究所使用的菌株和质粒见表 2。

表 2. 菌株和质粒

Table 2. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant characteristic	Source or reference
Strains		
<i>R.arachis</i> L8-3	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r	中科院沈阳生态研究所
<i>R.arachis</i> Ra-n	Nif ⁺ Hup ⁻ Ap ^r	This lab
<i>R.arachis</i> Rz-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r Tc ^r	This lab
<i>R.leguminosarum</i> L-n	Nif ⁺ Hup ⁻ Ap ^r	This lab
<i>R.leguminosarum</i> Lz-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r Tc ^r	This lab
<i>Rhizobium vulgaris</i> K-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r	This lab
<i>Rhizobium vulgaris</i> Kz-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r Tc ^r	This lab
<i>Rhizobium aerues</i> M-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r	This lab
<i>Rhizobium aerues</i> Mz-n	Nif ⁺ Hup ⁺ Ap ^r Tc ^r	This lab
Plasmids		
pRK2013	tra Km ^r	Ditta (1980)
pZ55	pLAFR3 containing hup gene fragment	This lab

2.2 培养基与培养条件

2.2.1 培养基

- 1 YEM 培养基：按文献[73]
- 2 TY 培养基：胰化蛋白胨 5g；酵母抽提物 3g；CaCl₂·2H₂O 0.93g；琼脂 1.8~2.0%(固体)；蒸馏水 1000ml pH7.0
- 3 LB 培养基：按文献[74]
- 4 改进的 HUM 培养基：按文献[75]
- 5 改进的 Keister 培养基：按文献[76]

2.2.2 培养条件

菌株	培养基	培养条件
Rhizobium	TY	28 °C 24h
	YEM	28 °C 24h
	HUM	28 °C 48h
	Keister	28 °C 24h、48h
E.coli	LB	37°C 12h~16h

2.3 主要仪器设备与试剂

2.3.1 主要仪器设备

ZFP 型手提式紫外分析仪	上海光明光学电子仪器厂
ZF-A1 型紫外透射分析仪	上海光明光学电子仪器厂
TGL-G16 台式高速离心机	北京医用离心机厂
LSJ-Ⅱ 离心沉淀机	上海医用分析仪器厂
DYY-Ⅲ4 型稳压稳流电泳仪	北京六一仪器厂
102G 型气相层析仪	上海分析仪器厂
103 型气相层析仪	上海分析仪器厂
722 分光光度仪	厦门分析仪器厂
电子天平 FA1004	上海天平仪器厂
改良型凯氏定氮仪	

2.3.2 主要试剂

1 常用化学试剂

SDS(电泳级); NaCl; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Na_2HPO_4 ; NaOAc; NH_4OAc ; KOAc; 无水乙醇; 苯酚; 氯仿; 异戊醇; 异丙醇; 甘露醇; Triton100; Tris 等
均为国产分析醇。

2 生化试剂

胰化蛋白胨; 酵母抽提物	Unipath 公司
琼脂糖	Promega 公司
溶菌酶	中科院上海生化所
牛血清白蛋白	Sigma 公司

DNA 分子量 Marker、 EDTA-Na_2 及本实验所用抗生素、RNase 等均购自美公司

3 常用溶液

(1) 碱变性提取质粒用液

Solution I: 葡萄糖 50 mmol/L; Tris-HCl 25 mmol/L (pH8.0); EDTA 10mmol/L (pH8.0)

Solution II: NaOH 0.2 mmol/L; SDS 1% (现配现用)

Solution III: KOAc (5mmol/L) 60 ml; 冰乙酸 11.5 ml; ddH_2O 28.5 ml

TE 1: Tris-HCl 10 mmol/L (pH8.0); EDTA 1 mmol/L (pH8.0)

STE: TE 1 (pH8.0); NaCl 0.1 mol/L

母液: 10% SDS; 10mol/L NaOH; 0.5mol/L EDTA (pH8.0); 3mol/L NaAc; 5mol/L

NaCl; 1mol/L Tris-HCl (pH8.0); 10% Sarcosyl

STET: STE+ 5% Triton

(2) 蛋白质比色测定用液

甲: 2% Na_2CO_3 (溶于 0.1N NaOH 溶液中)

乙: 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (溶于 1% 酒石酸钾或钠溶液中)

丙: 甲: 乙 (50: 1) 现配现用

丁: 2% Na_2CO_3 水溶液: 乙 (50: 1) 现配现用

戊: Folin 酚试剂

(3) 酶类溶液

溶菌酶: 以浓度 20 mg/ml 溶于无菌水中, 分装, -20°C 保存

RNase A: 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.8)-15mmol/L NaCl 中, 浓度为 20mg/ml, 100 °C 沸水浴处理 15 min, 分装, -20°C 保存

Pronase E: 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)-10mmol/L NaCl 中, 浓度为 20 mg/ml, 37 °C 温浴 1 h, 分装, -20°C 保存

(4) 抗生素储液

氨苄青霉素、卡那霉素溶于重蒸水; 氯霉素溶于乙醇; 储液浓度均为 20 mg/ml, 四环素溶于等体积的重蒸水和乙醇, 浓度为 20 mg/ml, 溶液用 0.22um 细菌过滤器除菌后, -20°C 避光保存

(5) 电泳缓冲液:

TAE(50×): 242g Tris, 57.1g 冰乙酸, 100 ml 0.5mol/L EDTA (pH8.0), 定容至 1 L

(6) 琼脂糖凝胶电泳加样缓冲液(6×):

溴酚蓝 0.25%, 蔗糖 40% (w/v), 4 °C 保存

(7) 苯酚-氯仿-异戊醇溶液: 按饱和重蒸酚-氯仿-异戊醇为 25:24:1, 并添加 8-羟基喹啉至终浓度为 0.1%, 4 °C 保存

(8) 总氮测定标准溶液:

准确称量邻苯二甲酸氢钾 408.4mg 溶于 20ml 蒸馏水 (除 CO₂) 标定得标准 NaOH, 标准 HCl, 0.5% 的标准 (NH₄)₂SO₄.

2.4 根瘤菌野生菌株的分离、Hup⁻菌株的筛选及特性检测

2.4.1 花生、四季豆等根瘤菌的分离

按文献[7]

2.4.2 抗性检测

有关菌株的抗生素抗性检测方法见文献[77]

2.4.3 根瘤菌吸氢活性测定

1. 挑新鲜根瘤菌单菌落接种于 YEM(Ap 浓度 50ug/ml) 培养液中, 28 °C, 摇床培养 24 h。

2. 取 200 ul 培养液接入 20 ml HUM 液体培养基中, 28 °C, 摇床培养 48 h。

3. 取 4 ml 培养物转入灭过菌的 24 ml 血清瓶, 然后换上翻口橡皮塞, 抽气充 N₂, 最后加入 H₂ 和 O₂, 控制瓶内气体比例为 N₂ : H₂ : O₂ = 85:10:5。28 °C 诱导培养。每天测定氢气量的变化。

4. 菌体蛋白的测定: 采用 Folin-酚法。

2.4.4 根瘤菌固氮活性的测定

1. 固氮酶的诱导: 菌体在 YEM 液体培养基中, 摇床培养 24h, 取 1ml 菌液接入 20ml 的 Keister 预培养液中, 28 °C 摇床培养 48h; 取出 2ml 菌液, 离心收集菌体, 用修改的 Keister 培养液 20ml 悬浮, 调节起始细胞浓度为 OD₅₄₀ 约 0.15, 28 °C 摇床培养 48h。

2. 固氮酶乙炔还原活性的测定: 取 4ml 上述菌液于 24ml 血清瓶中, 瓶口用翻口橡皮塞密封, 抽气充 Ar, 加入 C₂H₂ 和 O₂, 控制瓶内气体比例为 Ar : C₂H₂ : O₂ = 87:10:3, 定时在气相色谱上检测乙烯的生成量。

3. 菌体蛋白的测定: 采用 Folin-酚法。

2.4.5 根瘤菌大质粒的提取

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库